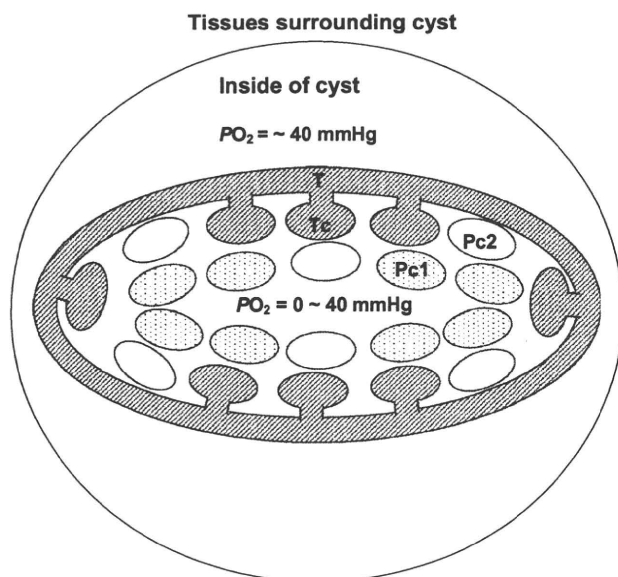


**Fig. 9.** Distribution of isolated *Paragonimus* mitochondria on isopycnic density gradient (35–55% (w/w) sucrose) centrifugation. Trematode mitochondria (24.9 mg protein) were centrifuged and the specific gravity (open circles), protein concentration (closed circles), and ratios of specific activity of cytochrome c oxidase (CCO) to fumarate reductase (FRD) (shaded bars) and of FRD to CCO (closed bars) were determined for each fraction. Specific activity of CCO and FRD for Fraction 3, giving the highest CCO/FRD  $\times 100$  value, is  $38.7 \text{ s}^{-1}/\text{ml}/\text{mg}$  and  $14.6 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ , respectively. Specific activity of CCO and FRD for Fraction 13, giving the highest FRD/CCO value is  $0.225 \text{ s}^{-1}/\text{ml}/\text{mg}$  and  $14.1 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ , respectively. Mitochondria with high FRD/CCO ratios were distributed between Fractions 13 and 23, with densities of 1.1920 and 1.2185 g/ml, respectively. Detailed experimental procedures are described in Section 2.



**Fig. 10.** Schematic cross-section of a cyst inhabited by adult *Paragonimus*. T and Tc represent the tegument and tegumental cells with aerobic mitochondria, and Pc1 and Pc2 represent types-1 and -2 parenchymal cells, respectively, the latter of which contain anaerobic mitochondria.  $PO_2$  represents oxygen tension.

At present, it is difficult to separate Pc1 and Pc2 mitochondria because they do not differ significantly in size. Mitochondria present in Fractions 8–12 (1.174–1.1845 g/ml), with low CCO/FRD and FRD/CCO ratios, may be intermediate between aerobic and anaerobic mitochondria. Alternatively, their higher CCO activity and larger size might suggest that they consist primarily of Pc1 mitochondria. Although we previously reported that Pc1 mito-

chondria in *P. ohirai* are aerobic (Fujino et al., 1996), the staining intensity for CCO activity of *P. westermani* Pc1 mitochondria was significantly lower than that of tegument/tegumental cell mitochondria. Interestingly, we observed two types of mitochondria, one heavily stained with clear cristae and the other lightly stained with few cristae, which appear to correspond to our in situ observations, although artifacts may have been introduced during staining. The Pc2 mitochondria can be safely categorised as anaerobic with high FRD/CCO ratios. To summarise the results, the distribution of the three types of mitochondria is schematized in Fig. 10.

The presence in adult *P. westermani* of mosaic cells containing different types of respiratory chains, with varied energy efficiency, is intriguing. This situation may be due to the environmental oxygen tension surrounding the trematodes. In contrast to adult *A. suum*, which dwells in the host small intestinal lumen with low oxygen tension ( $PO_2 = 0\text{--}10 \text{ mm Hg}$ ; Minning et al., 1999), oxygen tension inside the cysts in which adult *P. westermani* live is likely higher than in the intestinal lumen, although this has not been demonstrated to date. Since the  $PO_2$  of mammalian lung tissues through which blood circulates is approximately 40 mm Hg (Guyton, 1986), the  $PO_2$  inside cysts may be similarly high enough to drive the aerobic respiratory chain of mitochondria localised in the outermost tegument and tegumental cells. In contrast, the parenchymal cells, which are located under the tegument and in the innermost part of the body, are in an environment of much lower  $PO_2$ . Therefore, the  $PO_2$  of some parenchymal cells may be close to zero. Under these anaerobic conditions, as for adult *A. suum* (Kita and Takamiya, 2002; Yokota et al., 2006; Hashimoto et al., 2008; Takamiya et al., 2009), the parenchymal cells must depend on anaerobic respiration, in which fumarate functions as the electron acceptor instead of oxygen and oxygen homeostasis is maintained using haemoglobin and myoglobin. Thus, adult *P. westermani* adapt to their environmental conditions by optimising the mosaicism of their own tissues. Further studies are required to elucidate the mechanisms underlying aerobic–anaerobic transitions and the mosaic formation of tissues in these parasitic trematodes.

## Acknowledgements

This work was supported in part by Grants-in-Aids for Scientific Research (C) (Nos. 18590406 and 22590383) from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan, a research grant from the Institute of Health and Medical Sports Science, Graduate School of Health and Sports Science, Juntendo University, Japan (HRC-H17) to S.T., and a research grant from the Institute for Environmental and Gender Specific Medicine, Juntendo University to S.T. We are also indebted to the staff of the Division of Ultrastructural Research, Biomedical Research Center, Graduate School of Medicine, Juntendo University, for their helpful advice and guidance in performing the electron microscopic analyses and to Dr. Shinji Nakamura, Division of Biomedical Imaging Research, Biomedical Research Center, Graduate School of Medicine, Juntendo University, for statistical analyses.

## References

- Amino, H., Osanai, A., Miyadera, H., Shinjyo, N., Tomitsuka, E., Taka, H., Mineki, R., Murayama, K., Takamiya, S., Aoki, T., Miyoshi, H., Sakamoto, K., Kojima, S., Kita, K., 2003. Isolation and characterization of the stage-specific cytochrome *b* small subunit (CybS) of *Ascaris suum* complex II from the aerobic respiratory chain of larval mitochondria. *Mol. Biochem. Parasitol.* 128, 175–186.
- Behm, C.A., 2002. Metabolism. In: Lee, D.L. (Ed.), *The Biology of Nematodes*. Taylor and Francis, New York, pp. 261–291.
- Fujino, T., Fried, B., Takamiya, S., 1995. Cytochemical localization of cytochrome *c* oxidase activity in mitochondria in the tegument and tegumental and parenchymal cells of the trematodes *Echinostoma trivolvis*, *Zygocotyle lunata*, *Schistosoma mansoni*, *Fasciola gigantica* and *Paragonimus ohirai*. *J. Helminth.* 69, 195–201.
- Fujino, T., Takamiya, S., Fukuda, K., Aoki, T., 1996. Two types of parenchymal cells in the lung fluke *Paragonimus ohirai* (Digenea: Troglotrematidae) characterized by the cytochemistry of their mitochondria. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 113, 387–394.
- Guyton, A.C., 1986. Transport of oxygen and carbon dioxide in the blood and body fluids. In: *Textbook of Medical Physiology*, seventh ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 493–503.
- Hamajima, F., Fujino, T., Yamagami, K., Fukuda, K., 1982. Mitochondria in the body wall of life cycle stages of lung flukes of the genus *Paragonimus*, and mitochondrial cytochrome components of the adult worm. *Comp. Biochem. Physiol.* 71A, 149–156.
- Hashimoto, M., Takamiya, S., Yokota, T., Nakajima, Y., Yamakura, F., Sugio, S., Aoki, T., 2008. *Ascaris suum* cytochrome *b*<sub>5</sub>, an adult-specific secretory protein reducing oxygen-avid ferric hemoglobin. *Arch. Biochem. Biophys.* 471, 42–49.
- Iwata, F., Shinjyo, N., Amino, H., Sakamoto, K., Islam, M.K., Tsuji, N., Kita, K., 2008. Change of subunit composition of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone reductase/quinol-fumarate reductase) in *Ascaris suum* during the migration in the experimental host. *Parasitol. Int.* 57, 54–61.
- Kita, K., Takamiya, S., Furushima, R., Ma, Y.-C., Oya, H., 1988. Complex II is a major component of the respiratory chain in the muscle mitochondria of *Ascaris suum* with high fumarate reductase activity. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 89, 31–34.
- Kita, K., Takamiya, S., 2002. Electron-transfer complexes in *Ascaris* mitochondria. *Adv. Parasitol.* 51, 95–131.
- Komuniecki, R., Komuniecki, P.R., 1995. Aerobic-anaerobic transitions in energy metabolism during the development of the parasitic nematode *Ascaris suum*. In: Boothroyd, J.C., Komuniecki, R. (Eds.), *Molecular Approaches to Parasitology*. Wiley-Liss, New York, pp. 109–121.
- Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E., 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87, 206–210.
- Ma, Y.-C., Kita, K., Hamajima, F., Oya, H., 1987. Isolation and properties of complex II (succinate-ubiquinone reductase) in the mitochondria of *Paragonimus westermani*. *Jpn. J. Parasitol.* 36, 107–117.
- Minning, D.M., Gow, A.J., Bonaventura, J., Braun, R., Dewhirst, M., Goldberg, D.E., Stamler, J.S., 1999. *Ascaris* haemoglobin is a nitric oxide-activated deoxygenase. *Nature* 401, 497–502.
- Peters, T.J., Seymour, C.A., 1978. Analytical subcellular fractionation of needle-biopsy specimens from human liver. *Biochem. J.* 174, 435–446.
- Pollak, J.K., Munn, E.A., 1970. The isolation by isopycnic density-gradient centrifugation of two mitochondrial populations from livers of embryonic and fed and starved adult rats. *Biochem. J.* 117, 913–919.
- Seligman, A.M., Karnovsky, M.J., Wasserkrug, H.L., Hanker, J.S., 1968. Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diamminobenzidine (DAB). *J. Cell Biol.* 38, 1–14.
- Takamiya, S., Furushima, R., Oya, H., 1986. Electron-transfer complexes of *Ascaris suum* muscle mitochondria. II. Succinate-coenzyme Q reductase (complex II) associated with substrate-reducible cytochrome *b*-558. *Biochim. Biophys. Acta* 848, 99–107.
- Takamiya, S., Kita, K., Wang, H., Weinstein, P.P., Hiraishi, A., Oya, H., Aoki, T., 1993. Developmental changes in the respiratory chain of *Ascaris* mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1141, 65–74.
- Takamiya, S., Hashimoto, M., Kazuno, S., Kikkawa, M., Yamakura, F., 2009. *Ascaris suum* NADH-methemoglobin reductase systems recovering differential functions of hemoglobin and myoglobin, adapting to environmental hypoxia. *Parasitol. Int.* 58, 278–284.
- Takamiya, S., Wang, H., Hiraishi, A., Yu, Y., Hamajima, F., Aoki, T., 1994. Respiratory chain of the lung fluke *Paragonimus westermani*: facultative anaerobic mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 312, 142–150.
- Tielens, A.G.M., van den Bergh, S.G., 1993. Aerobic and anaerobic energy metabolism in the life cycle of parasitic helminths. In: Hochachka, P.W., Lutz, P.L., Sick, T., Rosenthal, M., van den Thillart, G. (Eds.), *Surviving Hypoxia: Mechanisms of Control and Adaptation*. CRC Press, London, pp. 19–40.
- Tielens, A.G.M., Rotte, C., van Hellemond, J.J., Martin, W., 2002. Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem. Sci.* 27, 564–572.
- Van Hellemond, J.J., Klockiewicz, M., Gaasenbeek, C.P.H., Roos, M.H., Tielens, A.G.M., 1995. Rhodoquinone and complex II of the electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *J. Biol. Chem.* 270, 31065–31070.
- Yamakami, K., Oguma, T., Hamajima, F., Fukuda, K., 1984. Mitochondrial cytochrome components of *Paragonimus* adult worms. *Int. J. Parasitol.* 14, 571–575.
- Yokota, T., Nakajima, Y., Yamakura, F., Sugio, S., Hashimoto, M., Takamiya, S., 2006. Unique structure of *Ascaris suum* b5-type cytochrome: an additional  $\alpha$ -helix and positively charged residues on the surface domain interact with redox partners. *Biochem. J.* 394, 437–447.

# EXPERIMENTAL INFECTION WITH *PARAGONIMUS HETEROTREMUS* METACERCARIAE IN LABORATORY ANIMALS IN MANIPUR, INDIA

T Shantikumar Singh<sup>1</sup>, Hiromu Sugiyama<sup>2</sup>, Kh Ranjana Devi<sup>3</sup>, L Deben Singh<sup>4</sup>,  
Sutheewan Binchai<sup>5</sup> and Achariya Rangsiruji<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Sikkim Manipal Institute of Medical Sciences, Sikkim, India; <sup>2</sup>Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan; <sup>3</sup>Department of Microbiology, Regional Institute of Medical Sciences, Manipur, India; <sup>4</sup>Department of Physiology, Sri Sathya Sai Medical College and Research Institute, Tamil Nadu, India; <sup>5</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok, Thailand

**Abstract.** This study was aimed to find out the host-parasite relationship between *Paragonimus heterotremus* isolated as metacercariae from mountain crabs, *Indochinamon manipurensis*, in Manipur, India and laboratory animals such as puppies, albino rats, Swiss mice, guinea pigs, and rabbits, as experimental animals. The animals were fed with the metacercariae. Infected animals were sacrificed 35 to 430 days after feeding to recover worms, which were used to determine the developmental stages. Adult worms ( $n = 14$ ) were recovered from 3 puppies  $\geq 70$  days after feeding and immature worms ( $n = 25$ ) were recovered from 2 other puppies 35 or 43 days after infection. The infection rate in puppies was 100%. Juvenile worms were recovered from 3 of 13 rats: 1 of 11 rats whose viscera and cavities were examined and both of two rats whose muscles were examined. Rats were not a suitable animal model for pulmonary infection with *P. heterotremus*. Mice, guinea pigs, and rabbits were also found to be insusceptible to pulmonary infection with *P. heterotremus*.

**Keywords:** *Paragonimus heterotremus*, puppy, metacercariae, host-parasite relationship, infectivity, India

## INTRODUCTION

In India, *Paragonimus westermani* isolation from tigers, bear cats, mongooses, civet cats and dogs has been reported (Rao, 1935; Dutt and Gupta, 1978; Singh and Somvanshi, 1978; Ravikumar *et al*, 1979; Parihar

and Shirivastava, 1988). *Paragonimus* eggs were also detected in fecal samples of civet cats and toddy cats in Manipur, India (Singh *et al*, 1998). A suitable animal model for *Paragonimus* infection is required to study the host-parasite relationship, pathogenesis, host immune response, and for the therapeutic evaluation of drugs. Adult worms are required for morphological and molecular characterization, as well as antigen preparations for the immunodiagnosis of paragonimiasis. Studies have shown that dogs and cats, especially puppies and

---

Correspondence: Hiromu Sugiyama, Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan.  
Tel: +81 3 5285 1111; Fax: +81 3 5285 1173  
E-mail: hsugi@nih.go.jp

kittens, are susceptible to most *Paragonimus* species prevalent in Asia, while rats and mice served as paratenic hosts when infected naturally or experimentally with some *Paragonimus* species (Shibahara, 1981; Sugiyama *et al*, 1990).

Little is known about experimental animal infection by *Paragonimus* species in India. Therefore, this study was conducted to develop a suitable laboratory animal model for *Paragonimus heterotremus* in a laboratory in Manipur, India. Human infection with this lung fluke species has been confirmed in Manipur (Singh *et al*, 2007) and Nagaland (Singh *et al*, 2009), a state neighboring Manipur.

#### MATERIALS AND METHODS

*Paragonimus heterotremus* metacercariae were isolated from freshwater crabs, *Indochinamon manipurensis* (Alcock, 1909), which were formerly referred to as *Potamiscus manipurensis*, at Churachandpur, Pashong Luwangsangbam Matai, and Motbung in the Manipur State of India (Singh *et al*, 2007). The isolation procedure of metacercariae from crabs was described previously (Rangsiruji *et al*, 2006). Using Pasteur pipettes, puppies ( $n = 5, 8$  to 50 metacercariae each), albino rats (Wistar strain,  $n = 11, 20$  metacercariae each), rabbits ( $n = 4, 20$  metacercariae each), Swiss mice ( $n = 4, 20$  metacercariae each), and guinea pigs ( $n = 4, 18$  metacercariae each) were inoculated orally with isolated metacercariae. Pipettes were all heated over a flame to smooth their edges before using for oral inoculation. The metacercariae, 20 each, were also inoculated to the peritoneal cavity of 2 other albino rats under ether anesthesia using the method described previously (Sugiyama *et al*, 1990). The animals were confirmed negative for *Paragonimus* infection by fecal examinations by the

formalin-ether sedimentation technique prior to experimental infection. They were autopsied 35 to 430 days after infection and the lungs, liver, and pleural and peritoneal cavities were examined. The skeletal muscles were also examined in some rats (Sugiyama *et al*, 1990). Recovered worms were examined under a microscope before and/or after Borax carmine staining and mounting to determine the developmental stage as adult, pre-adult, immature, and juvenile according to the criteria of Shibahara (1984).

#### RESULTS

The 5 puppies used in this study were all positive for *P. heterotremus* infection, and 39 flukes were recovered (Table 1). Fourteen flukes recovered 70 or more days after infection were adult (Fig 1), and those ( $n = 25$ ) recovered 35 and 43 days after infection were at the immature stage. Twenty-eight worms were recovered from 3 of the 13 rats. The flukes from rats were all determined to be at the juvenile stage (Table 2, Fig 2). No worms were recovered and no cysts were identified from the infected rabbits, mice, and guinea pigs.

#### DISCUSSION

The infection rate of puppies was 100%, and the worms recovered 70 or more days after infection with *P. heterotremus* metacercariae were all identified as adults. Employing puppies as an experimental host animal seems to yield sufficient numbers of worms required for morphological identification, antigen preparations, and molecular studies. The study of host immune responses and therapeutic evaluation of antihelminthic drugs can also be carried out in puppies.

The recovery of juvenile worms alone from only 3 of the 13 rats fed with *P. het-*

Table 1  
Results of experimental infection of puppies with *P. heterotremus* metacercariae.

| Puppy no. | Sex | Route of infection | No. of MC <sup>a</sup> | Autopsy at days after infection | No. (%) of worms recovered | No. of worms recovered from |       |                |       |                   |
|-----------|-----|--------------------|------------------------|---------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------|----------------|-------|-------------------|
|           |     |                    |                        |                                 |                            | Cyst in lungs               | Lungs | Pleural cavity | Liver | Peritoneal cavity |
| 1         | F   | Oral               | 20                     | 35                              | 5 (25)                     | 0                           | 1     | 2              | 0     | 2                 |
| 2         | M   | Oral               | 50                     | 43                              | 20 (40)                    | 0                           | 0     | 20             | 0     | 0                 |
| 3         | F   | Oral               | 20                     | 70                              | 5 (25)                     | 0                           | 0     | 5              | 0     | 0                 |
| 4         | F   | Oral               | 25                     | 330                             | 5 (20)                     | 4                           | 1     | 0              | 0     | 0                 |
| 5         | F   | Oral               | 8                      | 430                             | 4 (50)                     | 4                           | 0     | 0              | 0     | 0                 |

<sup>a</sup>MC, metacercariae

Table 2  
Results of experimental infection of albino rats with *P. heterotremus* metacercariae.

| Rat no. | Sex | Route of infection <sup>a</sup> | Autopsy at days after infection | No. of worms recovered (%) | No. of worms recovered from |       |                |       |                   | Muscle <sup>b</sup> |
|---------|-----|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------|----------------|-------|-------------------|---------------------|
|         |     |                                 |                                 |                            | Cyst in lungs               | Lungs | Pleural cavity | Liver | Peritoneal cavity |                     |
| 1       | F   | Oral                            | 50                              | 0                          | 0                           | 0     | 0              | 0     | 0                 | NE                  |
| 2       | F   | Oral                            | 50                              | 1 (5)                      | 0                           | 0     | 1              | 0     | 0                 | NE                  |
| 3       | F   | Oral                            | 90                              | 0                          | 0                           | 0     | 0              | 0     | 0                 | NE                  |
| 4       | F   | Oral                            | 90                              | 0                          | 0                           | 0     | 0              | 0     | 0                 | NE                  |
| 5       | M   | Oral                            | 90                              | 0                          | 0                           | 0     | 0              | 0     | 0                 | NE                  |
| 6       | M   | Oral                            | 112                             | 0                          | 0                           | 0     | 0              | 0     | 0                 | NE                  |
| 7       | M   | Oral                            | 114                             | 0                          | 0                           | 0     | 0              | 0     | 0                 | NE                  |
| 8       | M   | Oral                            | 120                             | 0                          | 0                           | 0     | 0              | 0     | 0                 | NE                  |
| 9       | F   | Oral                            | 142                             | 0                          | 0                           | 0     | 0              | 0     | 0                 | NE                  |
| 10      | M   | Oral                            | 152                             | 0                          | 0                           | 0     | 0              | 0     | 0                 | NE                  |
| 11      | M   | Oral                            | 159                             | 0                          | 0                           | 0     | 0              | 0     | 0                 | NE                  |
| 12      | M   | IP                              | 95                              | 14 (70)                    | 0                           | 0     | 0              | 0     | 0                 | 14                  |
| 13      | M   | IP                              | 95                              | 13 (65)                    | 0                           | 0     | 0              | 0     | 0                 | 13                  |

<sup>a</sup> 20 metacercariae were given orally or intraperitoneally (IP); <sup>b</sup> NE, not examined

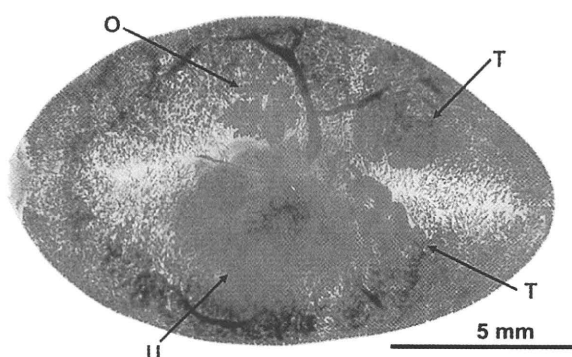


Fig 1—An adult fluke recovered from the lung cyst of tested puppy No. 3, 330 days after oral infection with *P. heterotremus* metacercariae. T, testes; O, ovary; U, uterus.

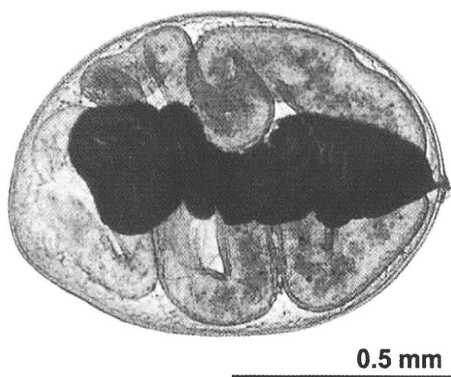


Fig 2—A juvenile fluke recovered from the muscle tissue of tested rat No. 12, 95 days after intraperitoneal infection with *P. heterotremus* metacercariae.

*erotremus* metacercariae showed that rats are not a suitable final host for this isolate. The rats served as paratenic hosts may be important for natural sources of infection of wild and domestic carnivorous animals.

Adult worms were recovered from rats experimentally infected with *P. heterotremus* experimenting in Thailand

(Sugiyama *et al*, 1990) and in Arunachal Pradesh, India (Narain *et al*, 2003). From our observations, together with the previous findings, the host-parasite relationship between *Paragonimus* species and laboratory mammalian hosts might be related to strain variation of the species and the selection of mammalian hosts in different geographical areas (Fan and Chiang, 1970; Habe, 1978; Habe *et al*, 1996). Dogs and cats, especially puppies and kittens, are susceptible to all *Paragonimus* species in Asia; these animals can serve as suitable models for experimental studies which require a greater number of adult worms and a longer host life span.

#### REFERENCES

- Dutt SC, Gupta PP. Paragonimiasis in a bear cat (*Arcticus binturong*). *Ann Trop Med Parasitol* 1978; 72: 391-3.
- Fan PC, Chiang CH. Exposure of kittens and puppies to single metacercariae of *Paragonimus westermani* from Taiwan. *J Parasitol* 1970; 56: 48-54.
- Habe S. Experimental studies on the mode of human infection with the lung fluke, *Paragonimus westermani* (Kerbert 1878). *Jpn J Parasitol* 1978; 27: 261-92 (in Japanese with English abstract).
- Habe S, Lai KPF, Agatsuma T, Ow-Yang CK, Kawashima K. Growth of Malaysian *Paragonimus westermani* (Kerbert, 1878) in mammals and the mode of transmission of the fluke among mammals. *Jpn J Trop Med Hyg* 1996; 24: 225-32.
- Narain K, Devi KR, Mahanta J. A rodent model for pulmonary paragonimiasis. *Parasitol Res* 2003; 91: 517-9.
- Parihar NS, Shrivastava SN. Bronchial hyperplasia in a tiger (*Panthera tigris*). *Indian J Anim Sci* 1988; 58: 230-3.
- Rangsiruji A, Sugiyama H, Morishima Y, *et al*. A new record of *Paragonimus* other than *P. westermani* in southern Thailand. *Southeast*

- Asian J Trop Med Public Health* 2006; 37 (suppl 3): 57-61.
- Rao M. Lung flukes in two dogs in Madras Presidency. *Indian J Vet Sci Anim Hus* 1935; 5: 30-2.
- Ravikumar S, Vijyalakshmi V, Hanumantharao K. Trematodes of the mongoose *Herpestes edwardsii* Geofroy from Visakhapatnam District. *Proc Indian Acad Sci B* 1979; 88: 421-4.
- Shibahara T. On the lung fluke *Paragonimus westermani*, from the freshwater crabs, *Geothelphusa dehaani*, in Tajima district, Hyogo Prefecture, Japan. (11) A survey of the natural final host and experimental infections of various animals with metacercariae. *Jpn J Parasitol* 1981; 30 (suppl): 61 (in Japanese).
- Shibahara T. Studies on the lung fluke, *Paragonimus westermani* -diploid type- in the northern part of Hyogo Prefecture, Japan. III. Experimental oral infection with metacercariae of rats, with reference to juvenile worms removed from the muscle. *Jpn J Parasitol* 1984; 33: 119-32 (in Japanese with English abstract).
- Singh NP, Somvanshi R. *Paragonimus westermani* in tigers (*Panthera tigris*) in India. *J Wildlife Dis* 1978; 14: 322-4.
- Singh TS, Singh YI, Singh KN. A case of paragonimiasis in a civet cat with a new *Paragonimus* subspecies in Manipur, India. *Indian J Pathol Microbiol* 1998; 41: 351-3.
- Singh TS, Sugiyama H, Rangsiruji A, Devi KR. Morphological and molecular characterizations of *Paragonimus heterotremus*, the causative agent of human paragonimiasis in India. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2007; 38 (suppl 1): 82-6.
- Singh TS, Sugiyama H, Umehara A, Hiese S, Khalo K. *Paragonimus heterotremus* infection in Nagaland: A new focus of paragonimiasis in India. *Indian J Med Microbiol* 2009; 27: 123-7.
- Sugiyama H, Shibahara T, Katahira J, et al. Rats and mice served as experimental paratenic hosts of Thai *Paragonimus heterotremus*. *Jpn J Trop Med Hyg* 1990; 18: 295-300.

## Case Report

## Cerebral paragonimiasis mimicking tuberculoma: First case report in India

T Shantikumar Singh, V Khamo<sup>1</sup>, H Sugiyama<sup>2</sup>

Department of Microbiology, Sikkim Manipal Institute of Medical Sciences, 5<sup>th</sup> mile, Tadong, Gangtok, <sup>1</sup>Naga Hospital Authority, Kohima, Nagaland, India, <sup>2</sup>Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

## KEY WORDS

Cerebral paragonimiasis, Brain CT Scan, Tuberculoma, India

## ABSTRACT

An 8-year-old male child of Tuensang District, Nagaland, India, attended Civil Hospital, Tuensang, complaining of cough, fever, headache, and inability to move right arm since one month. On clinical suspicion of tubercular meningitis, anti-tubercular therapy was initiated and the patient was referred to the Naga Hospital Authority. A brain computed tomography scan revealed an isodense area with surrounding edema on the left parietal lobe, which was diagnosed as tuberculoma and the anti-tubercular therapy was continued. As there was no sign of clinical improvement on completion of the three-month-ATD regimen, the patient was investigated for paragonimiasis. Laboratory investigations revealed peripheral blood eosinophilia, raised ESR, *Paragonimus* egg-positive sputum, and positive Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and ID tests for paragonimiasis. The Bacillus Calmette-Guérin (BCG) test and Acid Fast Bacilli (AFB) sputum smears were negative. Chest roentgenogram showed no abnormal findings. A final diagnosis of pulmonary paragonimiasis associated with cerebral paragonimiasis was made. The patient responded to praziquantel therapy. Cerebral paragonimiasis is a serious extrapulmonary form of paragonimiasis, sometimes life-threatening, but curable with praziquantel. It should be included in the differential diagnosis of cerebral granulomatous and other space-occupying lesions.

How to cite this article  
Singh TS, Khamo V, Sugiyama H.  
Cerebral paragonimiasis mimicking  
tuberculoma: First case report in India.  
*Trop Parasitol* 2010;1:39 - 41.

DOI: \*\*\*

## INTRODUCTION

Paragonimiasis is commonly manifested as pulmonary paragonimiasis, but extrapulmonary forms are not infrequent in humans. Singh *et al.*, in a review of 45 cases of paragonimiasis in children, found 20 (44.4%) extrapulmonary cases.<sup>[1]</sup> In another review of 247 cases in adults, the extrapulmonary forms were found in 2% of all the cases.<sup>[2]</sup> Extrapulmonary forms resulted from the erratic migrations of juvenile worms, which deviated from the normal route of migration to the lungs through the intestinal wall, peritoneal cavity, and diaphragm. The cerebral form is one of the typical examples of extrapulmonary forms due to erratic migrations. In this form, the worms enter the cranial cavity through the

jugular or carotid foramen and commonly invade the temporal and occipital lobes.<sup>[3]</sup> Cerebral paragonimiasis is a serious and sometimes fatal disease, although the symptoms are solely dependent on the site of localization and number of parasites.<sup>[4]</sup> Cerebral paragonimiasis have been reported mainly from China;<sup>[5]</sup> Korea;<sup>[6]</sup> Formosa;<sup>[7-8]</sup> and Japan.<sup>[9]</sup> We report the first case of cerebral paragonimiasis in India, which was combined with the pulmonary form.

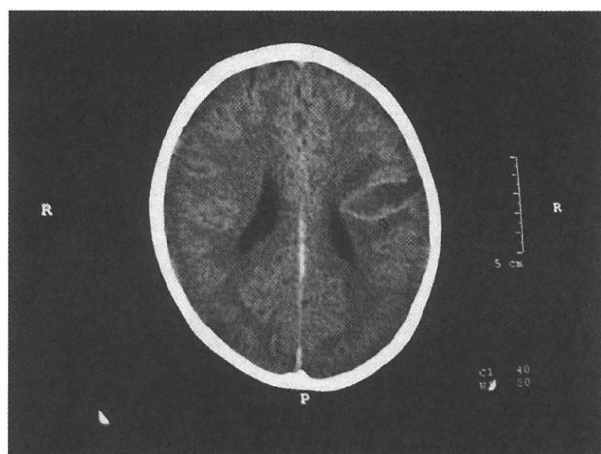
## CASE HISTORY

An 8-year-old boy of Tuensang district, Nagaland, India was admitted to the district hospital of Tuensang on 15 October, 2007, with chief complaints of cough, fever, headache, and inability to move the right arm since one month prior. The patient was provisionally diagnosed as a case of tubercular meningitis. Without any laboratory investigations, he was discharged on 22 October, 2007 to be admitted in a Civil Hospital, Tuensang, on 25 October,

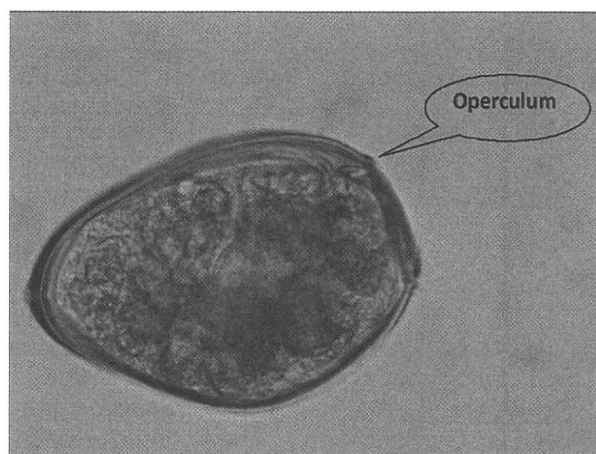
Address for correspondence  
Dr. T. Shantikumar Singh, Department of Microbiology, Sikkim Manipal Institute of Medical Sciences, 5<sup>th</sup> mile, Tadong, Gangtok-737 102, Sikkim, India. E-mail: shantikumar\_singh@rediffmail.com







**Figure 1:** CT scan of the brain showing an isodense area surrounded by edema (arrow) in the left parietal lobe



**Figure 2:** *Paragonimus* egg seen in the sputum smear (40x) not to be scaled

where he was given antitubercular therapy (Cat-II). In the absence of any appreciable improvement, the patient was transferred on 6 November, 2007 to the Naga Hospital Authority, where specialists and facilities for laboratory investigations, including computed tomography (CT) / X-ray / Ultrasonography were available. On 13 November, 2007, few laboratory investigations and CT scan of the brain were performed. The routine hematological test revealed Hb 11 gm%, total leucocyte count 8800 per cumm, neutrophils-58%, lymphocytes-25%, eosinophil-17%, and ESR (Westergren) 60 mm, at the end of the first hour. The BCG test was negative. A CT scan of the brain showed an isodense area with surrounding edema in the left parietal lobe [Figure 1]. A diagnosis of tuberculoma in the left parietal lobe was made and antitubercular therapy was continued. Sputum samples were negative for AFB, but positive for *Paragonimus* eggs [Figure 2]. Micro-ELISA and double immunodiffusion tests of the serum were positive for paragonimiasis. *Paragonimus heterotremus* adult extract was used for these tests, as an antigen. The patient gave a history of consumption of mountainous crabs. Based on these findings, the case was finally diagnosed as pulmonary paragonimiasis with cerebral involvement. The morphological and molecular characterizations of eggs from the sputum sample revealed features of *P. heterotremus*. Hence, the causative agent was identified as *P. heterotremus*. A high incidence of *P. heterotremus* metacercariae in mountainous crabs (Singh TS *et al.*, manuscript in preparation) supports this conclusion. A course of praziquantel was given in doses of 25 mg per kg body weight, thrice a day, for five days. Following the praziquantel therapy, the patient showed dramatic improvement clinically, during the follow-up period of three months post therapy.

## DISCUSSION

Cerebral paragonimiasis is one of the important

extrapulmonary forms with serious consequences and high mortality compared to the pulmonary form, which is usually benign. Most cases of cerebral disease are associated with chronic morbidity due to epilepsy, dementia, and various neurological sequelae. Rarely, the patient may die of cerebral hemorrhage. A rare case of cerebral paragonimiasis combined with cerebral hemorrhage was reported by Choo *et al.*<sup>[3]</sup> Cerebral paragonimiasis is usually diagnosed with the help of imaging techniques, such as, X-ray, Computerized Axial Tomography (CAT) scan, and magnetic resonance (MRI), and serodiagnosis (ELISA and others) is complemented. The CT and MRI of cerebral paragonimiasis generally show as conglomerates of multiple ring-shaped shadows or enhancements, called the 'grape cluster' or 'soap bubble' forms, in one hemisphere.<sup>[10]</sup> The present case is an exception of cerebral paragonimiasis with a granulomatous lesion in the left parietal lobe. As the case was associated with pulmonary paragonimiasis, the causative agent was identified as *P. heterotremus*, based on the morphological and molecular characterization of the eggs from the sputum sample. This case emphasizes the need for differential diagnosis between tuberculoma and cerebral paragonimiasis by careful history taking and laboratory investigations. If the clinicians were aware of the prevalence of paragonimiasis and its various clinical presentations, the delay in the correct diagnosis and therapy for cerebral paragonimiasis could have been avoided.

## REFERENCES

1. Singh TS, Singh PI, Singh LBM. Paragonimiasis: Review of 45 cases. *Indian J Med Microbiol* 1992;10:243-7.
2. Kulka F, Barabas M. Clinical aspects and X-ray diagnosis of paragonimiasis. *Acta med* 1955;7:371-90.
3. Choo JD, Suh BS, Lee HS, Lee JS, Song CJ, Shin DW, Lee YH. Chronic cerebral paragonimiasis combined with

| 発表者氏名  | 論文タイトル名   | 発表誌名                              | 巻  | ページ      | 出版年  |
|--|---|-----------------------------------|----|----------|------|
| Zhao, G.-H., Li, J., Chen, F., Zou, F.-C., Yang, J.-F., <b>Sugiyama, H.</b> , Xu, M.-J., Lin, Q., Lin, R.-Q. and Zhu, X.-Q.              | Variability in intron sequences of housekeeping and antigen-coding genes among <i>Schistosoma japonicum</i> isolates in mainland China. | Parasitology International        | 60 | in press | 2011 |
| Zhao, G.-H., Blair, D., Li, X.-Y., Li, J., Lin, R.-Q., Zou, F.-C., <b>Sugiyama, H.</b> , Mo, X.-H., Yuan, Z.-G., Song, H.-Q., Zhu, X.-Q. | The ribosomal intergenic spacer (IGS) region in <i>Schistosoma japonicum</i> : Structure and comparisons with related species.          | Infection, Genetics and Evolution | 11 | in press | 2011 |

| 発表者氏名  | 論文タイトル名                          | 発表誌名                             | 巻  | ページ     | 出版年  |
|--|----------------------------------|----------------------------------|----|---------|------|
| <b>杉山 広</b>  | 食品媒介寄生虫による食中毒                    | 日本食品微生物学雑誌                       | 27 | 1-7     | 2010 |
| 多々良成紀, <b>杉山 広</b> , 熊澤秀雄, 斑目広郎                    | 動物園飼育ミーアキャットにおける宮崎肺吸虫症の1例        | 日本野生動物医学会誌                       | 15 | 45-47   | 2010 |
| 高橋 岳, 三井良雄, 小泉信人, <b>杉山 広</b>                      | 刺身を原因食品として千葉市で発生したアニサキスによる食中毒    | 病原微生物検出情報                        | 31 | 142     | 2010 |
| 川中正憲, 山崎 浩, <b>杉山 広</b> , 森嶋康之, 荒川京子               | ペットとして飼育されているアライグマのアライグマ回虫に関する調査 | 病原微生物検出情報                        | 31 | 212-213 | 2010 |
| <b>杉山 広</b> , 柴田勝優, 森嶋康之, 山崎 浩, 川上 泰               | 肺吸虫の感染を予防するためのサワガニ加熱条件の検討        | Clinical Parasitology (臨床寄生虫学会誌) | 21 | 43-45   | 2010 |
| 山崎 浩, <b>杉山 広</b> , 森嶋康之, 大前比呂思, 椎木創一, 奥山久仁男, 国島文史 | Racemose 型有鉤囊虫による脳有鉤囊虫症の1例       | Clinical Parasitology (臨床寄生虫学会誌) | 21 | 29-31   | 2010 |
| <b>杉山 広</b>  | 食品と寄生虫感染症.                       | 食品衛生学雑誌                          | 51 | 285-291 | 2011 |

## 総 説

# 食品媒介寄生虫による食中毒

## Food-borne Parasitic Infection as Food Poisoning

杉山 広

(国立感染症研究所寄生動物部)

Hiromu SUGIYAMA

(Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases,

Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640)

### はじめに

食の安全・安心は、我々にとって大きな関心事となっている。この食の安全を担保する法律として、我が国では「食品衛生法」が重要な役割を果たしてきた。本法は「食品の安全性の確保のために公衆衛生の見地から必要な規制・措置を講じることにより、飲食に起因する衛生上の危害の発生を防止し、もって国民の健康の保護を図ることを目的とする（第1条）」として、1947年に制定された法律である。この条文に書かれている「飲食に起因する衛生上の危害」を、「飲食に起因する健康被害」と読み替え、さらにこれを「食中毒」としてとらえるのが、最近の行政上の、すなわち厚生労働省の方針となっている<sup>16, 20)</sup> ([http://www1.mhlw.go.jp/topics/syokueihou/tp1228-1\\_13.html](http://www1.mhlw.go.jp/topics/syokueihou/tp1228-1_13.html))。

### 食中毒の原因として対策を取る寄生虫

寄生虫も「飲食に起因する衛生上の危害」を引き起こすことから、「食中毒」の原因物質としてとらえる必要がある。我が国では、生鮮魚介類などの生食が嗜好され、食文化としても定着していることから、食品に媒介される寄生虫症の発生を認めることは、経験的にも知られている。この食品媒介寄生虫による疾患への対策を検討するため、1997年9月に当時の厚生省において、食品衛生調査会食中毒部会食中毒サーベイランス分科会が開催された。そのときにまず、我が国において特に対策が必要な寄生虫が指定された。検討に際しては、

- イ) 全国的に発生が多いもの、あるいは近年増加傾向にあるもの。
- ロ) 海外では発生が多く日本でも増加が懸念されるもの。
- ハ) 発生は多くなくとも重篤な被害が出る恐れのあるもの。

という三つの条件が考慮され、以下の14種類の寄生虫が対象として指定されることになった。

- 1) 原虫類 (4種類): 単細胞の寄生虫 (著者注)  
クリプトスポリジウム, サイクロスポーラ, ジアルジア, 赤痢アメーバ
- 2) 蠕虫類 (計10種類): 多細胞の寄生虫, 「ぜんちゅう」 (著者注)
  - (1) 生鮮魚介類により感染するもの (6種類)  
アニサキス, 旋尾線虫, 裂頭条虫, 大複殖門条虫, 横川吸虫, 顎口虫
  - (2) その他の食品 (獣生肉等) により感染するもの (4種類)

肺吸虫, マンソン孤虫, 有鉤囊虫, 旋毛虫

これら寄生虫の感染を予防するために当面取るべき対策として、まず「国民及び関係者への安全な摂食方法等についての普及啓発」が挙げられた。また「国内外での食品の寄生虫汚染の実態及び当該疾患の発生状況についての情報把握」などの事項も取るべき対策とされた<sup>17)</sup> (<http://www1.mhlw.go.jp/houdou/0909/h0917-1.html>)。

### 食品衛生法に則した食中毒の届出

寄生虫疾患の発生状況についての情報を把握するには、法に則した届出を確実にすることが有効な手段となる。寄生虫も「食中毒」の原因物質としてとらえることから、飲食に起因した寄生虫症が発生すれば、これを食中毒として届け出ることになる。

「食中毒」が発生した場合の届出に関しては、食品衛生法の第58条に規定がある。その第1項には「食品、添加物、器具もしくは容器包装に起因して中毒した患者もしくはその疑いのある者を診断し、またはその死体を検案した医師は、直ちに最寄りの保健所長にその旨を届け出なければならない」と記載されている (医師の届出は文書、電話または口頭により24時間以内に行わなければ

ならない：食品衛生法施行規則第 72 条）。実際には、「食中毒患者等届出票」の当該箇所（原因）に、食中毒事件票の「食中毒病因物質の分類」（表 1）にリストアップされている病因物質を記載して、医師から保健所に、食中毒事案としての届出が行われることになる。医師以外の者からの報告・苦情等は、食中毒の疑いのある事案として保健所が受け付ける<sup>20)</sup>。

#### 食品衛生法に則した寄生虫症の届出

「食中毒病因物質の分類」を見ると、寄生虫が食中毒の病因物質として、「22. その他」という範疇で取り上げられていることがわかる（表 1）。しかも具体的な例として、「クリプトスポリジウム、サイクロスポラ、アニサキス」の 3 種類の寄生虫が「等」という文字を付して掲げられている。この 3 種の寄生虫は、上述の食中毒部会で検討・指定された 14 種類の中に含まれる。

このように寄生虫名が「食中毒病因物質の分類」の中に例示された直接の契機は、1999 年の食品衛生法施行規則の一部改正にある。改正に当たり当時の厚生省から都道府県知事等に発出された通知を見ると、「原虫及び寄生虫による飲食に起因する健康被害についても食中毒としての取扱いを明確にするために、食中毒病因物質の分類のその他にクリプトスポリジウム等の例示を掲げた」と明記されている<sup>19)</sup> ([http://www1.mhlw.go.jp/topics/syokueihou/tp1228-1\\_13.html](http://www1.mhlw.go.jp/topics/syokueihou/tp1228-1_13.html))。寄生虫を原因とするものであっても、「飲食に起因する衛生上の危害」は「食中毒」として取扱い、食品衛生法に基づいて事案発生を届け出る。その結果として、事故が調査され、被害の拡大が防がれ、再発が防止される。このような寄生

虫症への対応に関する厚生労働省の見解には、現時点でも変更はない。

なお上述の通知では、寄生虫を「原虫及び寄生虫」という形で記述している。「原虫」を寄生虫から分離し、また蠕虫を単に「寄生虫」として表現したものと考えられる。

#### 寄生虫症の届出の実態

上述の食品衛生法施行規則の一部改正以降、食品衛生法に則して届け出る寄生虫症に変化があったか、食中毒統計に見てみたい（表 2）。すでに述べたように寄生虫は、食中毒の病因物質「その他」に分類されており、具体的な寄生虫として「クリプトスポリジウム、サイクロスポラ、アニサキス」という 3 種類が例示されている。しかしながら実際には、蠕虫である「アニサキス、肺吸虫、旋尾線虫」の 3 種類を病因物質とする事案が、食中毒として届け出られたに過ぎない。

我が国では、生鮮魚介類の生食が嗜好され、これを原因とした寄生虫症の発生があることは経験的にも知られている。なかでもアニサキスは病気の原因として知名度が高い。このアニサキス症の発生状況が、日本内視鏡学会会員や同学会指導施設等を対象としたアンケートにより調べられ、2001 年から 2005 年の 5 年間に 2,511 例の症例（年平均：502 例）が集計されている<sup>9)</sup>。このような成績も背景に、最近でも年間に 2,000 例以上のアニサキス症が、我が国で発生しているとの推定がある<sup>14)</sup>。しかしながら食中毒統計では、例えば 2001 年から 2008 年までの 8 年間の届出は、事件数（患者数）がわずか 38 件（38 名）にとどまる（年平均の患者数は約 4.8 名）。発

表 1. 食中毒病因物質の分類

|  |
|--|
| 1. サルモネラ属菌, 2. ぶどう球菌, 3. ボツリヌス菌, 4. 腸炎ビブリオ, 5. 腸管出血性大腸菌,             |
| 6. その他の病原大腸菌, 7. ウェルシュ菌, 8. セレウス菌, 9. エルシニア・エンテロコリチカ,                |
| 10. カンピロバクター・ジェジュニ/コリ, 11. ナグビブリオ, 12. コレラ菌, 13. 赤痢菌, 14. チフス菌,      |
| 15. パラチフス A 菌, 16. その他の細菌 (エロモナス・ヒドロフィラ等), 17. 小型球形ウイルス,             |
| 18. その他のウイルス (A 型肝炎ウイルス等), 19. 化学物質 (メタノール, ヒスタミン, ヒ素等), 20. 植物性自然毒, |
| 21. 動物性自然毒, 22. その他 (クリプトスポリジウム, サイクロスポラ, アニサキス等), 23. 不明            |

表 2. 食中毒の届け出 (食中毒統計)

| 年     | 食中毒届出総数<br>事件数 (患者数) | 病因物質 [その他]<br>事件数 (患者数) | アニサキス<br>事件数 (患者数) | 肺吸虫<br>事件数 (患者数) | 旋尾線虫<br>事件数 (患者数) |
|-------|----------------------|-------------------------|--------------------|------------------|-------------------|
| 1999  | 2,697 (35,214)       | 1 (1)                   | 1 (1)              | 0 (0)            | 0 (0)             |
| 2000  | 2,247 (43,307)       | 5 (53)                  | 4 (4)              | 0 (0)            | 0 (0)             |
| 2001  | 1,928 (25,862)       | 1 (1)                   | 1 (1)              | 0 (0)            | 0 (0)             |
| 2002  | 1,850 (27,629)       | 2 (25)                  | 0 (0)              | 0 (0)            | 0 (0)             |
| 2003  | 1,585 (29,355)       | 1 (1)                   | 1 (1)              | 0 (0)            | 0 (0)             |
| 2004  | 1,666 (28,175)       | 5 (8)                   | 4 (4)              | 1 (4)            | 0 (0)             |
| 2005  | 1,545 (27,019)       | 8 (8)                   | 7 (7)              | 0 (0)            | 0 (0)             |
| 2006  | 1,491 (39,026)       | 7 (23)                  | 5 (5)              | 0 (0)            | 0 (0)             |
| 2007  | 1,289 (33,477)       | 8 (20)                  | 6 (6)              | 1 (2)            | 0 (0)             |
| 2008  | 1,369 (24,303)       | 17 (47)                 | 14 (14)            | 0 (0)            | 0 (0)             |
| 2009* | 580 (12,111)         | 10 (10)                 | 9 (9)              | 0 (0)            | 1 (1)             |

\* 2009 年は 2009 年 12 月 18 日までの速報値で、同年 11 月中旬までの事件数 (患者数) を示す。

生の実態と食中毒統計との間に乖離があることは、疑う余地もない。さらに、「クリプトスポリジウム、サイクロスポラ」などを含めた原虫を原因物質とする事案は、食中毒としての届出が全くない（海外では原虫を原因とした食品媒介の症例報告がある<sup>6)</sup>）。届出を確実にするような対策の検討が必要である。

ここで本稿では、食中毒の原因として届出がある3種類の寄生蠕虫、すなわちアニサキス、肺吸虫及び旋尾線虫について以下に概説し、各寄生蠕虫に関する最近の話題を提出したいと思う。これら寄生蠕虫症に対する理解を深めて、法に則した届出をさらに促進していただきたい。

### アニサキスとアニサキス症

アニサキス症は古くからあった病気と考えられるが、その原因が *Anisakis* 亜科線虫（の幼虫）であることは、1960年にオランダから報告された事例をもって初めて確定された<sup>36)</sup>。我が国では、1964年発生の2例が本症としての最初の報告となる<sup>2)</sup>。当初は診断の方法がなく、急激な腹部症状から開腹して患部が切除され、病理学的に初めてアニサキス症であると診断された事例がほとんどであった。しかし1970年代になると、内視鏡での検査と生検用鉗子での虫体抽出が普及し、予想以上に多くの症例が発生していることが明らかとなった。

アニサキス症の原因となる虫種としては、クジラやイルカを終宿主とする *Anisakis simplex*（成虫が寄生する宿主を「終宿主」と呼ぶ）、マッコウクジラなどを終宿主とする *A. physeteris*、そしてアザラシやトドを終宿主とする *Pseudoterranova decipiens* の3種が重要である。これらの幼虫が魚介類に寄生しており、生きたままヒトに経口摂取されて消化管壁などに侵入し、アニサキス症を引き起こす。

アニサキス症はその発症部位によって、胃アニサキス症、腸アニサキス症及び消化管外アニサキス症に大別される。我が国で発生するアニサキス症の大部分は、激的な胃痛（心窩部痛）と悪心・嘔吐を主な症状とする胃アニサキス症と考えられる。原因となる主な虫種は、患者に由来する虫体の形態観察から、*Anisakis simplex* であると報告されてきた。

### アニサキス同胞種の分類学的解析

*A. simplex* の分類に関しては、アイソザイム解析や塩基配列解析などの先行研究の結果から、これを3種類の同胞種、すなわち *A. simplex sensu stricto*（狭義の *A. simplex*）、*A. pegreffii*、*A. simplex C* に分けるという考えが提出され、国際的にも受け入れられるようになってきた<sup>22)</sup>。同胞種とは、形態学的鑑別が困難であるが、自然下では（生殖隔離などで）互いに独立した関係にある種の集団を意味する。

この新しい分類基準に基づく同胞種の解析が我が国で

も試みられた。その結果、日本近海の魚に寄生するアニサキスは、北日本（北海道に水揚げされた太平洋産のサバ等）ではいずれも *A. simplex sensu stricto*、また南日本（九州に水揚げされた日本海産・東シナ海産のサバ）ではおおむね *A. pegreffii* であることが示された<sup>32, 35)</sup>。一方で、北海道及び九州の人体症例に由来する虫体は、ほとんどすべてが *A. simplex sensu stricto* と同定された<sup>33)</sup>。ヒトへの主たるアニサキスの感染源は、例えば九州ではサバと言われていたが<sup>38)</sup>、その九州においては、魚（サバ）寄生の優占種と患者由来の優占種とが異なるとの結果が、アニサキスの同胞種解析で得られたことになる<sup>34)</sup>。

本州で水揚げされたサバ（日本海産・太平洋産）に由来するアニサキスに関しても、同胞種レベルでの解析が行われ、その結果、*A. simplex sensu stricto* と *A. pegreffii* とが混在して寄生していることが明らかとなった<sup>35)</sup>。したがって、サバを原因とする九州のアニサキス症は、地元産ではなく他の地域から搬入された *A. simplex sensu stricto* 陽性のサバを原因とする可能性が高い。また、*A. simplex sensu stricto* が人体症例の主たる原因である理由については、*A. pegreffii* に比べてサバの筋肉から検出される虫体数のはるかに多いという検索結果をもって、説明されている<sup>31)</sup>。このように同胞種レベルでの解析は、感染源の特定にも有用で、それを適切に応用すれば、アニサキス症の発生予防に有効な啓発活動が展開できると考えられた。

### アニサキスによる食物アレルギー

食事をする中でアレルギー症状が起きる「食物アレルギー」に関して、魚介類の消費量が多い我が国では、魚介類も重要な原因食物となってきた。しかしながら、この魚介類アレルギーは、魚介類そのものがアレルゲンではなく、魚介類に寄生するアニサキスが原因であるとの興味深い知見が報告された<sup>10)</sup>。すなわち、サバの摂食後に蕁麻疹を呈した複数の症例や、さらに呼吸困難・心悸亢進などのアナフィラキシー症状を呈した症例について、アニサキス抗原を用いたスクラッチテストや血中抗体価 (IgE) の測定が行われた。その結果、サバに対しては陰性、アニサキスに対しては陽性となることが示された<sup>11, 12)</sup>。アニサキスに起因するアナフィラキシー症状（血圧降下・呼吸不全・意識喪失）は、散発事例だけでなく、集団発生事例でも観察されている（カタクチイワシが原因と推定された事例<sup>11)</sup>）。

一方で、魚介類の生食習慣が我が国ほど一般的ではないはずのスペインにおいても、1995年以降に、アニサキスに対するアレルギーの症例が150例以上も報告された<sup>3)</sup>。しかも、皮膚炎、喘息発作、関節炎、結膜炎など多彩な病態を示す症例が検出され、さらに虫体を殺滅するような加熱・冷凍などの処理を魚に施しても、アニサキスによるアレルギー反応の発現は必ずしも抑制されな

いことが示された<sup>4)</sup>。このようなアニサキスに起因するアレルギーに関しては、クローニングを含めたアレルギーの性状解析や発症に関連する免疫機構の解析などの研究が着々と進展しており、成果が上げられている<sup>5)</sup>。

### アニサキス症の予防

アニサキス症は、たとえ虫体1匹の感染であっても、発症の危険性がある。個人レベルでの予防は海産魚介類の生食を避けることに尽きる。アニサキスの幼虫は熱処理(60℃, 1分以上)のみならず、冷凍処理で不活化されることが知られているので、魚を冷凍し解凍後に生食することにより感染を予防できる。実際にオランダでは、ニシンに関して-20℃以下、24時間以上の冷凍を1968年に法律で義務づけた結果、以降のアニサキス症患者が激減した。冷凍以外の方法としては、新鮮なうちに虫体の主要寄生部位である内臓を摘出してしまうなど、調理上の工夫も有効である。事実、捕獲後の時間の経過で、アニサキスの幼虫は内臓から筋肉へと移行することを示す成績が、サバで報告されている<sup>31)</sup>。

### 肺吸虫と肺吸虫症

ここで話題を肺吸虫に変えたい。肺吸虫症の原因となる肺吸虫属の吸虫(吸虫は「ジストマ」とも呼ばれる)は、熱帯から温帯・亜寒帯に属する世界の各地に、約40種が分布する。人体症例は中間宿主のカニ(あるいはザリガニ)を生で、あるいは不完全な調理で食べるという伝統的な食習慣を持つ国々を中心に、風土病的に発生している。我が国にはウエステルマン肺吸虫(染色体構成により2倍体型と3倍体型の2型に大別される)、宮崎肺吸虫(我が国に固有の種と考えられてきたが、最近では中国原産のスクリアピン肺吸虫の亜種とする学説が有力)、大平肺吸虫の3種が北海道を除く各地、特に本州中部以西に広く分布し、前2種が人体寄生性である。

肺吸虫が生活環を営むためには、3種類の宿主が必要となる。まず、成虫が寄生する終宿主としては、肉食動物(時に雑食動物)がその役割を果たす(ヒトも終宿主)。また幼虫が寄生する宿主(これを「中間宿主」と呼ぶ)としては、淡水産・汽水産の貝類が第1中間宿主として、さらにザリガニ類や淡水産・汽水産のカニ類が第2中間宿主として、順次それぞれの役割を果たす。我が国では、第2中間宿主である淡水産のカニ(モクズガニ、サワガニ)がヒトへの感染源として重要である。

感染時に認める肺吸虫症の病態像は、原因種により異なる。すなわち、ウエステルマン肺吸虫(3倍体型)がヒトに感染した場合は、成虫が肺に形成された虫嚢内で成熟し、咳嗽や血痰が主徴となる。胸部X線では結節影や輪状影を認め、結核や肺癌との鑑別が時に重要となる。これに対してウエステルマン肺吸虫(2倍体型)では、宮崎肺吸虫がヒトに感染した場合と同様、虫体は十分に成熟しないまま胸腔内を移行し、その結果、自然気胸、

胸水貯留、胸痛などが主な症状となる<sup>23)</sup>。また肺吸虫は、肺以外の臓器・組織に迷入・異所寄生することも多く(脳・目・皮下など)、虫体の侵入部位に応じた症状を認めることがある。

肺吸虫の感染源となる淡水産カニの生食習慣がない我が国で、かつて肺吸虫症が流行していた。その理由は、カニの処理に用いた包丁やまな板を介して、メタセルカリアが次に調理される野菜などを汚染し、その野菜を非加熱で摂食して感染するからだと説明されてきた<sup>15)</sup>。このようないわば古典的な肺吸虫症の流行は、現在では、ほぼ終息したと考えられている。

一方で、イノシシが淡水産のカニ(特にモクズガニ)を捕食して、肺吸虫の幼虫(主に3倍体型のウエステルマン肺吸虫)を筋肉内に蓄積し、患者発生に重要な役割を果たすことが、1970年代に九州南部で証明された<sup>24)</sup>。イノシシのような動物を「中間宿主」と区別して、「待機宿主」と呼ぶ。現在でも、イノシシ肉の生食(非加熱摂食)の機会が多いハンターやその家族・関係者を中心に、肺吸虫の感染が集団事例を含め、西日本を中心に続いている。

この十数年来の話題として、アジア系外国人における肺吸虫症例の発生を挙げることができる<sup>13)</sup>。モクズガニやサワガニを食材とした出身地固有の料理を加熱なしで賞味し、肺吸虫に感染する事例である。このような料理の一例がモクズガニの老酒漬(酔蟹)である。本稿ではこれに関連する話題として、2004年の秋に佐賀県において発生した集団感染事例(4名が感染)に関し、届出の経緯と原因調査の結果を中心にして述べてみたい。併せて、アジア系外国人における肺吸虫症の発生と、その原因食材となる市販サワガニの肺吸虫汚染の実態について紹介したい。

### 佐賀県で発生した肺吸虫症の集団感染事例

表記の事例が届け出られた契機は、神奈川県内の病院に呼吸器症状で入院した患者(1名)を、担当医がウエステルマン肺吸虫感染と疑い、佐賀県でのモクズガニの食歴を確認し、血清学的に診断したことにある。さらに担当医は、「ウエステルマン肺吸虫による食中毒疑いの患者が入院」と神奈川県に連絡し、これを受けて神奈川県が、佐賀県に事例発見を知らせた。直ちに佐賀県が調査に取り組み、佐賀県の某料理店で老酒漬モクズガニを114名が摂食し、上述の患者を含めて合計4名が感染したことを明らかにした(2名は呼吸器症状を呈する有症者、2名は血清反応のみ陽性の無症者)。そして、地元保健所長から県知事に、さらに厚生労働省に、ウエステルマン肺吸虫による食中毒事件発生の届出がなされた<sup>7, 26)</sup>。このように自治体は、医師からの届出があれば、連携して食中毒に対応する行政上の機関であることを、ここに紹介しておきたい。

当該事例の原因食品となったモクズガニは、県北西部

を流れる玉島川で捕獲されていた。事例発生後に改めてモクズガニを採集し、69匹について肺吸虫メタセルカリアの寄生状況を検査した。その結果、肺吸虫陽性の個体は13匹で、寄生率は19%と高くはなかった。しかし陽性のモクズガニの中には、167個ものメタセルカリアが検出された個体も含まれていた<sup>25)</sup>。このように寄生数の極めて多いモクズガニが混在していたことを原因として、一部の感染者、例えば当該事例発見の契機となった神奈川県での症例で、モクズガニ摂食後8日という早期から、症状が観察されたと考えられた。

原因河川であった玉島川の漁業協同組合関係者に対して、地元住民の肺吸虫に関する知識の有無を尋ねた。地元では「モクズガニには肺吸虫がいる」と認識する者も多く、したがって「モクズガニは必ず加熱調理する」という回答を得た。しかしながら、当該事例の原因施設である料理店の調理担当者はこれを知らず、地元産モクズガニは安全であると誤認して、今回の事故を発生させた。このような形での肺吸虫症の発生を予防するには、料飲店関係者に対して、肺吸虫症の原因となる淡水産のカニ（モクズガニ、サワガニ）を提供するならば十分に加熱するように徹底した啓発を行い、これを継続する必要がある。このような啓発活動は、感染症・公衆衛生関係の専門家及び地方自治体の医療保健行政担当者の責務となる。

#### 食用に販売されていたサワガニにおける肺吸虫汚染

アジア系の外国人（中国人・韓国人・タイ人等）は、淡水産のカニを食材として積極的に利用し、これを加熱なしで摂食する固有の食文化を持つ。我が国に在住する間も、彼らはこの食習慣を維持し、時に日本産の肺吸虫に感染する。飲食を共にすることで日本人も感染しており、輸入食習慣に起因する新たな肺吸虫症の流行として、注意の必要がある<sup>13)</sup>。

これら外国人の肺吸虫症事例では、市販のサワガニが原因食材となった場合も多い。そこで我々は、市販の食用サワガニに注目して調査を行い、肺吸虫メタセルカリアがサワガニを高率に汚染し、非常に危険である事実を警告してきた<sup>29)</sup>。以下にその知見を整理し、サワガニを感染源とする肺吸虫症で起こりうる問題点を指摘したい。

生鮮魚介類を取扱う東京都内の小売店で、2004年4月から2008年2月に、合計266匹の食用サワガニを購入し、肺吸虫メタセルカリアの寄生状況を調べた。その結果、44匹(17%)からメタセルカリアが検出された。これらは、形態及び塩基配列から肺吸虫の種類に関する同定を試みたところ、多くが宮崎肺吸虫であり、さらにウェステルマン肺吸虫（2倍体型・3倍体型）も認めることを明らかにした。また福岡市で市販されていた食用サワガニからも、宮崎肺吸虫のメタセルカリアが検出された<sup>28, 30)</sup>。我が国で食用として流通するサワガニは、肺

吸虫症の原因食品として危険であり、摂食するのであれば十分な加熱が必要である。関係者には、この事実の発信・啓発をお願いしたい。

食用として市販されていたサワガニからは、我が国での人体寄生種である肺吸虫のメタセルカリアがすべて検出された。すなわち、サワガニを原因として肺吸虫に感染した場合、ウェステルマン肺吸虫（3倍体型）による咳漱・血痰を主徴とする事例と、ウェステルマン肺吸虫（2倍体型）あるいは宮崎肺吸虫による気胸・胸水を主徴とする事例が、共に起こりうる可能性が示唆された。さらに、複数種（複数型）の肺吸虫に同時感染する事例の発生も危惧していたところ、実際に、ウェステルマン肺吸虫（3倍体型）と宮崎肺吸虫の虫卵を喀痰中に認める1症例を経験した（高坂ら、投稿準備中）。サワガニを原因食品とする肺吸虫症では病態が複雑となり、さらに血清学的な手法による原因虫種の特定が困難となる場合も懸念される。注意が必要である。

#### 肺吸虫症例の発生実態と届出

肺吸虫症の発生状況を、食中毒統計に見てみたい（表2）。その数は残念ながら著しく少なく、上述の2004年に佐賀県で感染した患者4名の事例のほかには、2007年に福岡市で発生した患者2名の1件しか届出がない。寄生虫症の血清診断に積極的に取り組む宮崎大医学部寄生虫学教室では、年間に30~40例の肺吸虫症例を経験されるとのことから<sup>21)</sup>、我が国では年間に50例を超える肺吸虫症例が発生しているのは疑いないが、実際の届出数はこれに遠く及ばないのが現状である。

#### ホタルイカの生食による旋尾線虫症

話題を旋尾線虫に変えたい。旋尾線虫（X型幼虫、「X型」は「じゅうがた」と読む）による幼虫移行症は、1980年代半ばから知られるようになってきた新顔の寄生蠕虫症である。ヒト以外の動物を固有宿主とする寄生蠕虫の幼虫が、ヒトに感染しても成虫に発育することなく、幼虫のままで人体内を移行し、さまざまな症状（症候群）を引き起こすことがある。これを幼虫移行症と呼んでいる。

旋尾線虫による幼虫移行症は、ホタルイカの生食後に、主として腸閉塞あるいは皮膚爬行症の形で発症する。ホタルイカは従来、限られた産地でのみ非加熱で賞味されてきた。しかし漁獲から運搬に至る技術の進歩（コールドチェーンの普及）により、生鮮状態での遠隔地輸送が可能となった。この結果、本症が日本の各地で発生するようになった。

本虫の幼虫は、感染源となるホタルイカのほかに、スケトウダラ、ハタハタ、スルメイカ、アンコウからも検出されていた。しかしながら、成虫及び終宿主が長く不明であったために、分類学的な位置（種名）が確定していなかった。最近の研究により、本虫は旋尾線虫亜目の

*Crassicauda giliakiana* であり、終宿主はツチクジラで、その腎臓に成虫が寄生することが明らかにされた<sup>27)</sup>。

### 旋尾線虫症の予防対策

旋尾線虫の感染を予防して、ホタルイカを安全に摂食するという観点から、ホタルイカの処理方法について検討が行われた。その結果、

1.  $-30^{\circ}\text{C}$ で4日間以上などの冷凍
2. 沸騰水で30秒、もしくは中心温度で $60^{\circ}\text{C}$ 以上の加熱

という条件が、本虫の感染予防に有効なことが明らかにされた。この検討結果を踏まえて、生食用のホタルイカを販売するに際しては、上述の条件で冷凍する、内臓(虫体の主要寄生部位)を除去する、あるいは内臓を除去してから生食する旨を表示する、のいずれかの方法を採用するように、当時の厚生省から各都道府県知事等に通知が発出された<sup>18)</sup>。このような取り組みが、以後の症例数の減少にも貢献していると考えられる。しかしながら、旋尾線虫による症例の報告は継続しており、食中毒としての届出も認める(表2)。発生予防に関する啓発活動を継続することが重要となる。

### おわりに

本稿では、食品衛生法における寄生虫症の取扱いについての説明から始め、法に則した届出が実際に認められるアニサキス、肺吸虫及び旋尾線虫について、最近の話題を交えて概説した。

飲食に起因する衛生上の危害は、原虫・蠕虫のいずれが原因物質である事案であっても、食品衛生法に則した食中毒としての届出が必要となる。これが徹底されれば、食品における寄生虫汚染の実態及び当該疾患の発生状況が正確に把握されるようになり、病気の発生予防にも役立つことが期待される。

届出に際しては、食中毒部会で検討・指定された14種類の寄生虫、また「食中毒病因物質の分類」に例示された3種類の寄生虫が一つの目安となる。しかしながら、飲食に起因する健康被害があれば、原因の寄生虫の種類が何であれ、食中毒として届け出るとというのが、厚生労働省の見解である。何よりも、医師からの届出、さらに医師以外の者からの報告等が重要である。この点を最後に改めて指摘しておきたい。

### 謝 辞

本稿に関連する情報を提供していただき、また本稿に対して貴重な意見をいただいた共同研究者・関係者の各位に感謝いたします。

### 文 献

- 1) 安藤由紀男, 林 幸夫, 畑 英一, 新村宗敏, 小島莊明: 千葉県鴨川市及び周辺地域において発生したアニサキス

症、即時型アレルギー様症状を伴った集団発生例。寄生虫誌, 41(1・補), 81 (1992).

- 2) Asami, A., Watanuki, T., Sakai, H., Imago, H. and Okamoto, R.: Two cases of stomach granuloma caused by *Anisakis*-like larval nematodes in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **14**, 119-123 (1965).
- 3) Audicana, M. T., Ansotegui, I. J., Corres, L. F. and Kennedy, M. W.: *Anisakis simplex*: Dangerous-dead and alive? *Trends Parasitol.*, **18**, 20-25 (2002).
- 4) Audicana, L., Audicana, M. T., Corres, L. F. and Kennedy, M. W.: Cooking and freezing may not protect against allergenic reactions to ingested *Anisakis simplex* antigens in humans. *Vet. Rec.*, **140**, 235 (1997).
- 5) Audicana, M. T. and Kennedy, M. W.: *Anisakis simplex*: From obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clin. Microbiol. Rev.*, **21**, 360-379 (2008).
- 6) Dawson, D.: Foodborne protozoan parasites. *Int. J. Food Microbiol.*, **103**, 207-227 (2005).
- 7) 平野敬之, 増本久人, 船津丸貞幸, 藤原義行, 池添博士, 杉元昌志, 松崎祐己, 森田満雄, 杉山 広, 森嶋康之, 荒川京子, 川中正憲: 平成16年秋に集団発生した肺吸虫による食中毒事例について. *Clin. Parasitol.*, **17**, 60-62 (2006).
- 8) 飯野治彦, 内田 哲, 今村和之, 古沢 毅, 柴田興彦, 松本興三, 須古博信, 福田 実, 山下行博, 長谷川英男, 安里龍二: 九州のアニサキス症—1~8次アンケート調査—総まとめ (1962年3月~1990年6月). *臨床と研究*, **70**, 3563-3576 (1993).
- 9) 唐澤洋一, 平福一郎, 星 和夫: 最近の消化管アニサキス症—第2回全国集計調査—. *日医事新報*, (4386), 68-74 (2008).
- 10) Kasuya, S., Hamano, H. and Izumi, S.: Mackerel-induced urticaria and *Anisakis*. *Lancet*, **335**, 665 (1990).
- 11) 粕谷志郎: アニサキスとじんま疹. *病原微生物検出情報*, **25**, 119-120 (2004).
- 12) 粕谷志郎, 古賀香理: *Anisakis* 関連疾患における特異IgE測定の意義. *アレルギー*, **41**, 106-110 (1992).
- 13) 川中正憲, 荒川京子, 森嶋康之, 杉山 広: 在日外国人固有の食習慣に起因する肺吸虫症. *病原微生物検出情報*, **25**, 121-122 (2004).
- 14) 川中正憲, 荒木 潤: アニサキス症—発生状況とその予防—. *食品衛生研究*, **56**, 17-22 (2006).
- 15) Komiya, Y., Yokogawa, M., Shichijo, K., Nishimiya, H., Suguro, T. and Yamaoka, K.: Studies on paragonimiasis in Shizuoka Prefecture. I. An epidemiological survey of *Paragonimus westermani* along the banks of the Kano River. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **5**, 341-350 (1952).
- 16) 厚生省生活衛生局長: 食品衛生法施行規則の一部を改正する省令の施行等について. *食品衛生研究*, **50**(2), 114-116 (2000).
- 17) 厚生省生活衛生局食品保健課長・乳肉衛生課長: 食品媒介の寄生虫疾患対策等について. *食品衛生研究*, **47**(11), 86-95 (1997).
- 18) 厚生省生活衛生局食品保健課長・乳肉衛生課長: 生食用ホタルイカの取扱いについて. *病原微生物検出情報*, **25**,



- 115 (2004).
- 19) 厚生省生活衛生局食品保健課長・乳肉衛生課長・食品化学課長：食中毒統計作成要領の一部改正について。食品衛生研究, **50**(2), 117-120 (2000).
  - 20) 熊谷優子：我が国における食中毒対策の取り組み～食中毒被害情報管理室の行政上の役割～。日獣会誌, **62**, 902-907 (2009).
  - 21) 丸山治彦, 名和行文：肺吸虫。日胸, **66**, 269-275 (2007).
  - 22) Mattiucci, S. and Nascetti, G.: Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: An update. Parasitol., **13**, 99-113 (2006).
  - 23) 宮崎一郎：医学上重要なベルツ肺吸虫。福大医紀, **9**, 221-232 (1982).
  - 24) 宮崎一郎, 木船悌嗣, 寺崎邦生, 岩田久寿郎, 広瀬浩士：若いウェステルマン肺吸虫—イノシシの筋肉に自然感染—。日医事新報, (2748), 23-25 (1976).
  - 25) 杉山 広, 森嶋康之, 荒川京子, 川中正憲, 平野敬之, 増本久人, 池添博士：平成 16 年秋に集団発生した肺吸虫による食中毒事例—原因の寄生虫学的精査—。Clin. Parasitol., **19**, 63-66 (2006).
  - 26) 杉山 広, 森嶋康之, 荒川京子, 川中正憲, 平野敬之, 増本久人, 船津丸貞幸, 藤原義行, 池添博士, 杉元昌志, 松崎祐己, 森田満雄：2004 年秋に集団発生した肺吸虫による食中毒事例について。病原微生物検出情報, **27**, 277-278 (2006).
  - 27) 杉山 広, 森嶋康之, 荒川京子, 木白俊哉, 川中正憲：旋尾線虫をめぐる新しい展開。寄生虫分類形態談話会報, **25**, 4-7 (2007).
  - 28) 杉山 広, 梅原梓里, 森嶋康之, 川中正憲, 山崎 浩：市販サワガニを対象とした肺吸虫メタセルカリアの寄生状況調査。Clin. Parasitol., **19**, 89-91 (2008).
  - 29) 杉山 広, 梅原梓里, 森嶋康之, 川中正憲, 山崎 浩：食用として販売されていたサワガニからの肺吸虫メタセルカリアの検出。病原微生物検出情報, **29**, 284-285 (2008).
  - 30) Sugiyama, H., Umehara, A., Morishima, Y., Yamasaki, H. and Kawanaka, M.: Detection of *Paragonimus metacercariae* in Japanese freshwater crab, *Geothelphusa dehaani*, bought at retail fish markets in Japan. Jpn. J. Inf. Dis., **18**, 252-253 (2009).
  - 31) Suzuki, J., Murata, R., Hosaka, M. and Araki, J.: Risk factors of human *Anisakis simplex* infection and association between the geographical origins of *Scomber japonicus* and anisakid nematodes. Int. J. Food Microbiol., **137**, 88-93 (2010).
  - 32) Umehara, A., Kawakami, Y., Araki, J., Matsui, T. and Uchida, A.: Molecular identification of *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. Parasitol. Int., **55**, 267-271 (2006).
  - 33) Umehara, A., Kawakami, Y., Araki, J. and Uchida, A.: Molecular identification of the etiological agent of the human anisakiasis in Japan. Parasitol. Int., **56**, 211-215 (2007).
  - 34) Umehara, A., Kawakami, Y., Araki, J., Uchida, A. and Sugiyama, H.: Molecular analysis of Japanese *Anisakis simplex* worms. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health, **39**(Suppl. 1), 26-31 (2008).
  - 35) 梅原梓里, 杉山 広, 川上 泰, 内田明彦, 荒木 潤：同胞種レベルでみた日本産 *Anisakis simplex*：感染源の特定に向けた検討。Clin. Parasitol., **19**, 114-117 (2008).
  - 36) van Thiel, P. H., Kuipers, F. C. and Roskam, R. T.: A nematode parasitic to herring, causing acute abdominal syndromes in man. Trop. Geographic. Med., **2**, 97-113 (1960).

# 動物園飼育ミーアキャットにおける宮崎肺吸虫症の 1 例

多々良成紀, 杉山 広, 熊沢秀雄, 斑目広郎

日本野生動物医学会誌 *Jpn. J. Zoo Wildl. Med.* Vol.15 No.1  
pp. 45-47

## 動物園飼育ミーアキヤットにおける宮崎肺吸虫症の1例

多々良成紀<sup>1)</sup>, 杉山 広<sup>2)</sup>, 熊沢秀雄<sup>3)</sup>, 斑目広郎<sup>4)</sup>

1) 高知県立のいち動物公園 〒781-5233 高知県香南市野市町大谷738

2) 国立感染症研究所寄生動物部 〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1

3) 高知大学医学部寄生虫学教室 〒783-8505 高知県南国市岡豊町小蓮

4) 麻布大学附属動物病院小動物臨床研究室 〒229-8501 神奈川県相模原市淵野辺1-17-71

(2009年9月24日受領, 2010年2月24日採択)

### First Record of *Paragonimus miyazakii* Infection in Captive Meerkat (*Suricata suricatta*) in Japan

Seiki TATARA<sup>1)</sup>, Hiromu SUGIYAMA<sup>2)</sup>, Hideo KUMAZAWA<sup>3)</sup> and Hiroo MADARAME<sup>4)</sup>

1) Noichi Zoological Park of Kochi Prefecture, Konan, Kochi 781-5233, Japan

2) Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku, Tokyo 162-8640, Japan

3) Department of Parasitology, Kochi Medical School, Nankoku, Kochi 783-8505, Japan

4) Laboratory of Small Animal Clinics, Veterinary Teaching Hospital, Azabu University, Sagami-hara, Kanagawa 229-8501, Japan

**ABSTRACT.** Two adult flukes were found in a cyst in the left lung of a captive meerkat (*suricate*, *Suricata suricatta*) in a zoo in Kochi Prefecture, Japan. They have been identified as *Paragonimus miyazakii* Kamo, Nishida, Hatsushika et Tomimura, 1961, on the basis of morphological features of the adult flukes and those of the eggs in the feces, as well as a ribosomal DNA sequence. The suricate was possibly infected by ingesting wild Japanese freshwater crab (*Geothelphusa dehaani*) wandering into the place of breeding exhibition. This is the first confirmed case of *P. miyazakii* infection in a meerkat imported to a Japanese zoo.

Key words : lung fluke, meerkat, *Suricata suricatta*, *Paragonimus miyazakii*, zoo animal

*Jpn. J. Zoo. Wildl. Med.* 15(1) : 45-47, 2010

ミーアキヤット(スリカータ, *Suricata suricatta*)はマンゲース科(Herpestidae)に属し、アフリカ南部に生息する。通常、雑食性であるが、昆虫や小動物への嗜好性が高い。高知県立のいち動物公園で飼育・展示していたミーアキヤットの1例が急死した。剖検にて、肺に肺吸虫の寄生が認められた。ミーアキヤット以外のマンゲース科の動物における肺吸虫の寄生は既に報告されているが、ミーアキヤットでの同寄生虫感染の報告はない[1]。まれな症例と考えられたので、以下にその概要を報告する。

高知県立のいち動物公園は、高知県中東部、香南市野市町の金剛山(三宝山)南西山麓に位置する。その山側に面したミーアキヤットの飼育施設は、四方をガラスフェンス、擁壁、空堀で囲まれた開放型で、夜間は附属する獣舎に動物を収容していた。1996年に野生1群10頭を南アフリカより導入し、その後数回の繁殖と死亡・搬出などを経て、2007年6月9日時点

で全4頭を同居飼育中であった。

2007年6月9日、雌1例が活力低下を示して急死した。歯牙の摩耗度から比較的高齢と考えられたが、個体識別をしておらず当初導入個体か繁殖個体かは不明であった。

剖検では、肺は全葉赤色を帯びて剖面湿潤、左肺の後葉内側面に径約1cm大の嚢胞形成が認められ、嚢胞内から吸虫成体2隻が抽出された(図1)。虫嚢(嚢胞)周囲の肺実質には、多中心性暗赤色斑が認められた。左右腎臓には、皮質深部から髓質にかけて小豆～米粒大の黄白色の結節状病変が数個ずつ認められた。心臓では、左心大動脈弁に有疣状心内膜炎を疑う病変が観察された。

肺および腎臓から常法に従い病理組織標本を作製し、病理組織学的に検索した。肺に認められた虫嚢は、線維性の厚い壁と内部の腔状構造からなり、内腔には虫卵を容れた好酸性球性膿成分の貯留が認められた。肺実質では、多中心性出血病変に加え、

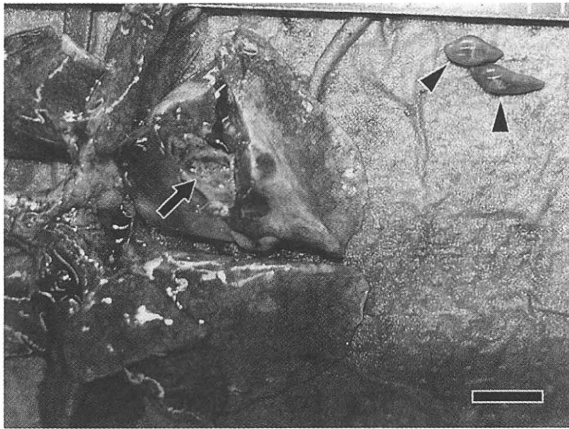


図1 左肺に形成された虫嚢(矢印)と虫嚢内に寄生していた2隻の肺吸虫成体(矢頭)  
スケールバーは10mm。

複数の肺動脈と気管支動脈の腔内に、新鮮な血栓形成が観察された。特に肺動脈に認められた血栓は、塞栓症として死因に関連する病変と推定された。しかし、血栓の由来を特定することはできなかった。腎臓の結節状病変は、腎盂(腎盤)に連絡する壊死物質を含む嚢胞と判明し、その辺縁部には石灰沈着巣が認められたが、細胞反応は乏しく、肺吸虫感染との明らかな関連はみられなかった。

虫嚢から得た2隻の吸虫成体は、大きさが各々10×4.5mm、8×4.5mmで、いずれも腹吸盤が口吸盤より大きかった。連続薄切標本作製して観察したところ、卵巢は基幹

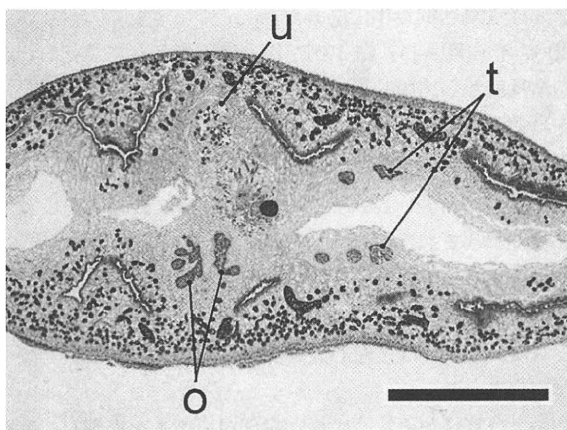


図2 肺吸虫成体の薄切標本(虫体中央部, HE染色)  
o: 卵巢, t: 精巣, u: 子宮および内部の虫卵。  
スケールバーは2mm。

部から分岐して複雑に分葉し、精巣では分葉構造が明らかで、内腔には精子形成過程の各種細胞(精祖細胞・精子細胞・精子)が認められた(図2)。虫嚢内と直腸便からは均一で薄い卵殻壁を有する吸虫卵(長径73~79 $\mu$ m)が検出され(図3)、成虫体の形態学的特徴と併せて宮崎肺吸虫(*Paragonimus miyazakii*)と同定された。また、成虫体の薄切標本からDNAを抽出し、リボソームDNAのITS2領域をPCR増幅して塩基配列を解読したところ、既報の宮崎肺吸虫の配列(国際塩基配列データベースのアクセッション番号:U96912)と一致した。

高知県立のいち動物公園では、降雨量の多い時期に山麓から雨水が公園内まで流れ込むことがある。そうした際、山側に面したミーアキャットの飼育施設周辺では、宮崎肺吸虫の第2中間宿主であるサワガニ(*Geothelphusa dehaani*)が散見される。また、施設構造上、サワガニが擁壁を乗り越えるなどしてミーアキャットの飼育施設内に侵入することは可能と思われる。高知県は宮崎肺吸虫の分布域として知られており[2]、本動物公園の位置する香南市野市町内で採取されたサワガニからも宮崎肺吸虫のメタセルカリアが検出されている[3]。また最近、本動物公園に近隣する地域において、複数のネコの宮崎肺吸虫感染例が報告されている[4]。宮崎肺吸虫は日本の固有種であることから、今回の症例は、本動物公園で飼育中に宮崎肺吸虫陽性のサワガニを摂食したことにより感染したものと推定された。なお、同居の3頭については、本症例の発生直後に糞便検査(直接法と時計皿法)を実施したが、肺吸虫卵は検出されなかった。このうちの1例は、本症例発生の1か月後に死亡したが、剖検でも肺吸虫の寄生は認められなかった。残る2例は、発生の6か月後に糞便検査で肺吸虫卵陰性を再度確認し、その4か月後に本園から搬出された。

宮崎肺吸虫は、国内の野生動物では、イタチ類(*Mustela*

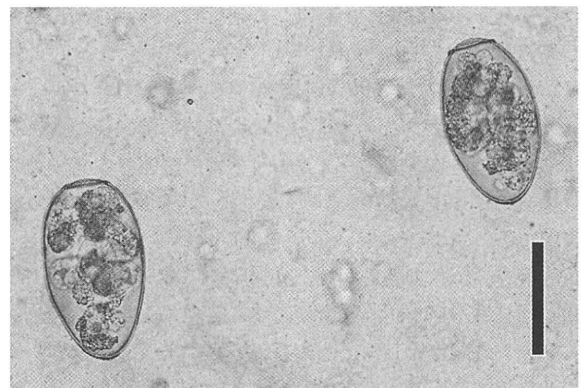


図3 直腸便から検出された吸虫卵(生鮮標本)  
スケールバーは50 $\mu$ m。